DOI：10.12287/j.issn.2096-8965.20230401

肥大软骨细胞在骨折愈合中的作用

朱道宇，高俊杰，高悠水*

（上海市第六人民医院，上海 200233）

【摘要】骨折愈合是一个多因素的过程。软骨内成骨是骨折愈合的重要途径，包括软骨骨痂的形成和软骨向骨的转化过程。肥大软骨细胞是软骨细胞的终末成熟状态，位于软骨性骨痂和骨性骨痂之间，以自分泌和旁分泌方式调节细胞基质降解、血管化、破骨细胞募集和成骨细胞分化。此外，肥大软骨细胞可以转分化成为成骨祖细胞和成骨细胞，并直接促进编织骨的形成。阐明肥大软骨细胞在骨折愈合中的作用将有利于认识骨折愈合的生理机制，进而有助于促进骨折愈合治疗模式的研发，加速骨折的愈合。

【关键词】骨折；肥大软骨细胞；软骨内成骨；骨发育学

中图分类号：R683　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：2096-8965（2023）04-0002-08

The role of hypertrophic chondrocytes in fracture healing

Zhu Daoyu, Gao Junjie, Gao Youshui*

(Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China)

【**Abstract**】Fracture healing is a multifactorial process. Most fractures are healed by the process of endochondral ossification, involving the formation of a cartilaginous soft callus and the process of cartilage-to-bone transition. Hypertrophic chondrocytes have been considered as the terminal state of chondrocytes, which locate between soft cartilaginous callus and bony hard callus. Hypertrophic chondrocytes mediate the crosstalk regulating cell-matrix degradation, vascularization, osteoclast recruitment, and osteoblast differentiation via autocrine and paracrine manners. Furthermore, hypertrophic chondrocytes can become osteoprogenitors and mature osteoblasts, and directly contribute to woven bone formation. In summary, elucidating the role of hypertrophic chondrocytes will contribute to the understanding of the physiological mechanism of fracture healing, research and development of novel therapeutic mode of fracture care, and further promoting fracture healing.

【**Keywords**】Fracture; Hypertrophic chondrocytes; Endochondral bone formation; Bone development

0　前言

骨折是人类最常见的大器官损伤[1]。骨折发生后，血肿形成，这是一系列信号分子的关键来源，包括激素、生长因子、化学因子及细胞等，这些分子结合到骨前体细胞的受体上，使其增殖和分化，最终发展为组织再生所需的两种主要的细胞：成骨细胞（Osteoblast）和软骨细胞（Chondrocyte）。

收稿日期：2023-10-04；**修回日期**：2023-12-02

基金项目：国家自然科学基金项目（82072417）

通信作者：高悠水（1981-），男，安徽芜湖人，副主任医师，主要从事股骨头坏死发病机制以及组织工程技术的研究。

E-mail：gaoyoushui@sjtu.edu.cn

成骨细胞主要在膜内成骨（Intramembranous Ossification）中发挥作用，在骨折临近区域和骨膜下形成坚固的骨痂。软骨细胞主要在软骨内成骨（Endochondral Ossification）中发挥作用，在骨折趋于中间部分形成软骨痂，连接骨折的两端[2]。软骨内成骨的过程与长骨发育过程相似，由间充质前体细胞凝聚而成，分化成软骨细胞，依次经历增殖期、成熟期、肥大期和终末分化期[3-5]。软骨到骨的转变对于获得骨折的稳定性和刚性必不可少。此过程延迟或失败会导致骨愈合受损，如骨折不愈合或延迟愈合[6-8]。软骨向骨的转变包括软骨基质降解、血管侵入和骨形成等多个过程，涉及多个细胞群，包括软骨细胞、内皮细胞、破骨细胞和骨细胞。其中，位于软骨痂和硬骨痂交界处的肥大软骨细胞（Hypertrophic Chondrocyte）起中介作用。无血管软骨基质的降解由肥大软骨细胞启动，招募其他类型的细胞和血管迁移。肥大软骨细胞还表达血管内皮生长因子（Vascular Endothelial Growth Factor，VEGF），诱导血管生成，加速软骨基质的降解。肥大软骨细胞还可通过形成骨形态发生蛋白2（Bone Morphogenetic Protein 2，BMP-2）等生长因子促进成骨[9-10]。肥大软骨细胞也可进一步分化为骨祖细胞，直接促进骨形成。因此，肥大软骨细胞在软骨内成骨中发挥了重要作用，对骨折愈合的各个阶段至关重要。

1 骨发育学

骨骼形成始于胎儿阶段，来自于三个不同的胚胎结构：（1）体节，生成轴向骨骼；（2）侧板，生成肢体骨骼；（3）神经峰，生成头面部骨骼[11]。骨骼形成的启动始于来自这些胚胎谱系的间充质细胞迁移到未来骨骼的位置，形成高细胞密度的凝聚体[12]。在凝聚体中，间充质细胞分化为软骨细胞，形成未来骨骼的软骨模型（软骨内成骨），或分化为成骨细胞，直接形成骨（膜内成骨）。在软骨内成骨中，矿化骨替代软骨是一个重要的过程，由软骨原中心增殖的软骨细胞分化为非增殖性肥大状态而触发。随后成骨前体细胞、破（软）骨细胞、造血细胞和血管内皮细胞从软骨膜侵入肥大软骨区域，肥大软骨细胞及相应基质被吸收降解，进入的成骨祖细胞分化为成骨细胞，造血细胞和内皮细胞在成为主要成骨中心的地方建立骨髓[13]。软骨膜中的成骨前体细胞分化为成骨细胞，在软骨骨原基周围沉积皮质骨。随着胎儿的成长，初级骨化中心扩大，在发育中的骨骼的一端或两端形成次级骨化中心，促进了骨骺生长板软骨的发育，负责骨骼的纵向生长[14-16]。随着年龄的增长，生长板变薄，最终在青春期后的不同时间被骨骼取代。

2 软骨内成骨

骨折愈合在病理组织学上可分为四个阶段：炎症期、软骨痂形成期、硬骨痂形成期、骨痂重塑期。这四个阶段相互重叠，有助于描述骨折愈合的全过程[17-19]。软骨内成骨是硬组织生物学的基本过程，由骨取代软骨基质，是多数骨骼形成的过程，也是长骨增加长度的主要方式。软骨内成骨的过程通常是由肥大软骨细胞的程序性细胞死亡开始，随后基质金属蛋白酶13（Matrix Metalloproteinase-13，MMP-13）、MMP-9启动对横向矿化基质的吸收，伴随着来自骨髓的血管生成细胞和成骨细胞的侵入[20]。在此过程中，软骨内成骨主要作为产生肥大软骨细胞的手段，而肥大软骨细胞反过来又启动由其他细胞启动的软骨下骨形成。肥大软骨细胞转分化为成骨细胞在软骨内成骨中同样发挥重要作用。

3 肥大软骨细胞在骨折愈合中的作用

3.1 肥大软骨细胞

软骨细胞肥大化是软骨细胞体积迅速增大、代谢和分子水平发生明显变化，从而使细胞体积经历10～20倍放大的过程。这一过程促进了持续的软骨内成骨，并在不同物种哺乳动物的纵向骨生长中发挥了重要作用[21-22]。肥大软骨细胞表现为体积增大，特征性表达MMP-13、X型胶原（Collagen X）和VEGF[23-25]。这些蛋白可从周围组织中招募成骨细胞前体，促进血管形成和细胞外基质矿化。既往的研究认为，肥大软骨细胞是生长板软骨细胞的终末状态，导致退行性成熟，表现为细胞周期停滞、核固缩和细胞凋亡[5]。然而，有研究表明，部分肥大软骨细胞可经历“转分化”，并直接在原始海绵体内成为成骨细胞[26-27]。因此，肥大软骨细胞的“终末”状态应该更准确地描述为“瞬时”状态，即对外界刺激作出反应而被重新编程为成骨样状态的能力（见图1）。此外，肥大软骨细胞是核因子kappa-B配体受体激活剂（Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand，RANKL）的主要来源，在软骨内成骨过程中，RANKL是诱导破骨细胞生成和形成骨髓空间以及维持骨吸收和形成之间的平衡所必需的[28]。RANKL介导的多核“破软骨细胞”在肥大带软骨矿化基质中含量最高[29-30]。

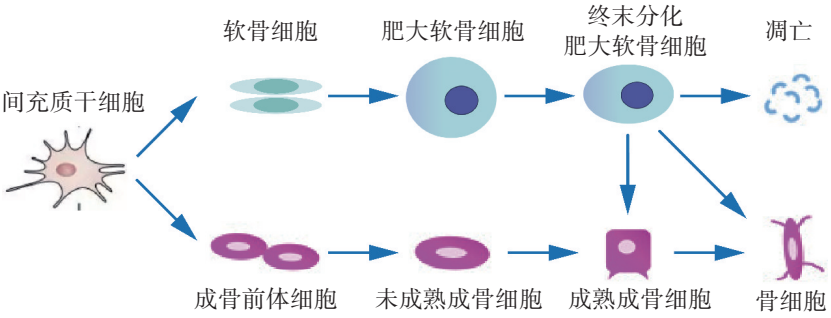


图1　肥大软骨细胞的分化、转分化和凋亡

3.2　肥大软骨细胞介导软骨与骨之间的交互

肥大软骨细胞在软骨向骨的转化过程中发挥着多种作用。软骨向骨转变的第一步是软骨组织的快速降解和吸收。两种基质金属蛋白酶，MMP-13和MMP-9在软骨降解和血管形成中起着至关重要的作用。在小鼠骨折模型中，骨痂中软骨细胞的数量和大小在骨折后第9-14天达到最大，当软骨细胞成熟为肥大软骨细胞时开始表达MMP-13[31]。MMP-9是软骨降解和血管形成的另一个关键酶，由内皮细胞、炎症细胞、破骨细胞和其他骨髓系细胞表达[32-33]。*Mmp13*基因缺陷小鼠生长板肥大带扩大，缺乏胶原酶介导的胶原断裂，血管形成延迟，表明在胚胎和出生后发育过程中，生长板肥大软骨细胞MMP-13的表达是软骨吸收和发育所必须的[34]。在骨折骨痂中，MMP-13缺失会导致软骨基质如聚集素的降解受损，骨痂中软骨体积增大和软骨吸收延迟[35-36]。研究表明，MMP-13和MMP-9在降解软骨基质，如Ⅱ型胶原和聚集素方面发挥协同作用，同时缺乏MMP-13和MMP-9的小鼠表现出更严重的软骨内骨形成障碍[34]。然而，移植野生型小鼠的骨髓可以修复*Mmp9*缺陷小鼠的软骨吸收缺陷，但对*Mmp13*缺陷小鼠无明显作用[32,35]。这一结果表明，MMP-9和MMP-13的产生来源不同，肥大软骨细胞来源的MMP-13对于骨折愈合过程中软骨向骨的转变是必不可少的。相反，*Mmp9*缺陷小鼠中肥大软骨细胞MMP-13的表达上调，但不足以弥补生长板表型的缺陷[37]。综上所述，在骨折愈合时软骨向骨的转变过程中，肥大软骨细胞分泌的MMP在软骨降解过程中发挥着协同但不可替代的作用。

3.3　肥大软骨细胞调控骨-血管偶联

骨化中心的血管化是形成髓腔的必经过程。毛细血管长入软骨板，进而启动矿化的过程。多种生长因子如VEGF，表皮生长因子和血小板来源生长因子在生长板中表达并调控血管生成[38-39]。血管对软骨骨痂的侵袭始于软骨内骨化的终末阶段，并同软骨痂基质降解、软骨向骨的转化和硬骨痂的重塑相互偶联。骨痂中肥大软骨细胞在促进血管形成方面发挥重要作用，并与内皮细胞和骨祖细胞相互作用[40-41]。

肥大软骨细胞表达的VEGF通过招募血管长入诱导骨化中心血管化。抑制VEGF的表达可导致股骨短缩，增强*Col10a1*的表达，并和干骺端血管排列紊乱相关。VEGF介导的干骺端血管生长启动肥大软骨细胞的凋亡，使用VEGF拮抗剂Flt-(1-3)-IgG可导致生长板软骨细胞肥大化停滞，肢体短缩[42-43]。当表达*Col2a1*的软骨细胞中的VEGF被沉默时，血管对软骨的侵袭受到抑制，肥大软骨细胞的程序性死亡增多[44]。利用条件基因敲除软骨细胞中VEGF刺激因子*Runx2*间接研究了VEGF在肥大软骨细胞中的特殊作用，发现生长板中血管形成减少，同缺乏VEGF表达有关[45]。使用*Col10a1-Cre*; *Runx2* $^{flox/flox}$小鼠敲除肥大软骨细胞中的*Runx2*，原发海绵组织中肥大软骨细胞和成骨细胞中不表达VEGF。然而软骨的血管化未受明显抑制，骨领中的成骨细胞VEGF的表达明显上调，表明生长板中的血管生成受到多种来源的VEGF的调节，包括软骨细胞、肥大软骨细胞和成骨细胞[46]。在小鼠胫骨皮质缺损模型中，抑制*Osx-Cre*; *Vegfa* $^{flox/flox}$小鼠肥大软骨细胞和骨前体细胞中VEGF的表达导致血管化和软骨转变延迟[47]。

内皮细胞也可作用于软骨和软骨细胞。Romeo等[48]证实内皮细胞形成H型毛细血管，表达PECAM-1和Endomucin，产生MMP-9，对生长板中软骨基质的吸收是必不可少的。内皮细胞也是软骨细胞和骨细胞直接的调节器。内皮细胞的增殖和血管生成需要Notch信号。Notch正向调控血管内皮细胞中Noggin的表达，Noggin调控血管周围成骨祖细胞的成骨分化。Notch-Noggin通路促进软骨细胞的成熟和肥大，并通过增加肥大软骨细胞VEGF的表达为血管生成建立了正循环[49]。

3.4　肥大软骨细胞与成骨细胞之间的关联

肥大软骨细胞位于软骨与骨的交界处，在软骨

向骨的转变过程中与骨祖细胞和成骨细胞相关联。这种关联由多个信号分子如Hedgehog、Wnt和BMP介导[50-56]。Hedgehog信号通路在物种间广泛保守，在骨骼和新陈代谢中发挥重要作用[57]。在小鼠生长板中，印度刺猬因子（Indian hedgehog，Ihh）在肥大前期的软骨细胞和部分肥大软骨细胞中表达，调节生长板软骨细胞的增殖和分化。Ihh在成骨分化中也发挥重要作用[3]。*Ihh*缺陷小鼠缺乏位于肥大区域两侧的骨领[58]。条件基因敲除软骨细胞中的*Ihh*导致成骨细胞中Wnt信号的减少和骨小梁的丢失[59]。相反，另一组研究表明，Ihh缺乏不是体外成骨细胞分化所必须的，但会对软骨膜和血管形成造成不利影响[60]，提示Ihh在骨领形成中的重要作用。总之，肥大软骨细胞产生的Ihh在骨形成过程中直接或间接调节周围骨祖细胞的成骨分化。

与生长板类似，Ihh在骨折愈合过程中的骨形成也发挥重要作用。在骨折愈合过程中可检测到Ihh的表达。成年大鼠股骨骨折后7天左右，肥大前期软骨细胞开始表达Ihh蛋白，2周后在肥大软骨细胞中检测到Ihh蛋白。随着新骨的形成过程，成骨细胞也表达Ihh蛋白[61]。在骨痂中，*Ihh*的表达和*Col10a1*的表达有很大重叠。表达*Ihh*的细胞周围的细胞高表达Hedgehog反应基因*Ptch1*和*Gli1*，表明Ihh信号在软骨内骨折修复过程中处于活跃状态[62]。Wang等[63]利用*Ptc1-LacZ*报告小鼠证明在编织骨中，各种类型的细胞如间充质细胞、软骨前体细胞、增殖的软骨细胞、内皮细胞和成骨细胞对Hedgehog信号有反应，抑制该信号会抑制新骨形成。强度脉冲超声刺激或全身应用Smo激动剂增加Hedgehog信号可促进骨折愈合过程中骨痂的形成和血管生成[64-65]。应用Smo抑制剂会延迟股骨骨折的骨痂矿化，但不会影响软骨生成、血管生长和最终的愈合[66]。在不同的应力性骨折模型中，Smo抑制剂会损害成骨细胞分化和血管生成，从而导致骨形成减少[67]。综上所述，肥大软骨细胞产生的Hedgehog信号可能通过偶联软骨形成和成骨而促进骨折愈合，但需要进一步研究不同骨折模型的确切机制。

经典Wnt/β-catenin通路是调节肥大软骨细胞和周围细胞相互作用的另一个重要通路[68-72]。在表达*Col10a1*的软骨细胞中，Wnt/β-catenin信号的促进或降低均可抑制骨形成。敲除β-catenin导致*Rankl/Opg*比值增加，导致骨吸收增加，而上调β-catenin可诱导肥大带延长，Osterix^{+}和Runx2^{+} *Col10a1*系细胞数量增多[73-74]。Wnt/β-catenin信号通路失活可抑制软骨细胞肥大，而Wnt/β-catenin通路可通过BMP-2信号通路促进肥大软骨细胞的终末分化[75]。目前尚不清楚Wnts是否直接或间接地介导了肥大软骨细胞和成骨细胞的相互作用。

BMP信号通路是骨形成所必需的通路。在小鼠肥大软骨细胞中，BMP激动剂（Bmp2和Bmp6）、BMP受体（Bmpr1a、Bmpr2、Acvr1b和Acvr2a）和细胞外BMP拮抗剂（Nog）均有表达[76-78]。在肥大软骨细胞中，Smad1/5/8磷酸化水平降低，但Smad的抑制剂Smad7表达增高，表明虽然肥大软骨细胞中BMP2和BMP6高表达，但BMP信号通路表达降低[76]。*Bmp6*缺陷小鼠表现出骨皮质横截面面积减少，但松质骨骨量没有变化，并且不能通过雌激素的作用促进软骨内骨形成[79]。复合缺陷小鼠（*Bmp2*$^{+/-}$; *Bmp6*$^{+/-}$）表现出中度生长迟缓和骨小梁减少，而单缺陷小鼠（*Bmp2*$^{+/-}$或*Bmp6*$^{+/-}$）无明显表现。*Bmp2*$^{+/-}$; *Bmp6*$^{+/-}$复合缺陷小鼠的骨髓细胞成骨分化能力并无明显降低。这些结果表明，肥大软骨细胞产生的BMPs可以促进成骨细胞分化和骨形成[80]。

既往的研究结果表明，软骨内成骨时软骨被骨取代的过程伴随着终末分化的肥大软骨细胞的死亡。然而，近年来的细胞示踪技术表明，大量的肥大软骨细胞可以在骨痂中存活并转分化为成骨细胞[81-84]。Yang等[81]证明在出生前、出生后和骨损伤的修复过程中，肥大软骨细胞可转变为表达Col10a1的成骨细胞和表达sclerostin的骨细胞。Zhou等[26]使用*Col10a1-Cre*标记肥大软骨细胞的小鼠和*Agc1-CreERT2*标记软骨细胞的小鼠证明生长板上的软骨细胞和肥大软骨细胞均可在骨小梁和骨皮质中成为成骨细胞，表达Col10a1的肥大软骨细胞分化而来的成骨细胞约占1月龄小鼠软骨内所有成熟成骨细胞的60%，在成年小鼠的骨折愈合过程中，也观察到了肥大软骨细胞到成骨细胞转分化的相似过程。在小鼠下颌骨骨折模型中也可观察到肥大软骨细胞向成骨细胞的转变[85]。

肥大软骨细胞转分化为成骨细胞的机制尚不十分清楚。Hu等[4]证明位于软骨痂和硬骨痂过渡区的肥大软骨细胞可表达BrdU和Ki67，表明其中一些肥大软骨细胞重新进入细胞周期。此外，这些细胞表达干细胞特征性分子Oct4、Sox2和Nanog。因此，在过渡区靠近血管的肥大软骨细胞可去分化为骨软骨前体细胞，获得多能性，随后在硬骨痂中形成成骨细胞和骨细胞[4,82]。Park等[27]在*Col10a1-Cre*; *YFP*小鼠生长板肥大带最底层发现了共表达Osx的

小型增殖性YFP阳性的细胞，并提出这些小细胞是肥大软骨细胞向成骨细胞过渡的细胞。最近的一项研究表明，在*Col10a1-Cre*和*Col10a1-CreERT*小鼠骨髓中表达*Col10a1*的细胞的后代包括一个具有成骨和成脂分化能力的干细胞亚群[86]。这些发现表明，在骨折愈合过程中，肥大软骨细胞可能作为祖细胞的储存库，至少部分地转变为成骨细胞和骨细胞。然而，这一概念仍然需要更直接的观察来验证。

3.5 肥大软骨细胞调控成骨-破骨偶联

肥大软骨细胞表达RANKL并调节破骨细胞的形成。骨形成的成骨细胞和骨吸收的破骨细胞之间的偶联维持着骨稳态[87-88]。RANKL由成骨细胞系的细胞表达，促进破骨细胞的形成[89]。在成骨细胞中条件性敲除RANKL导致肥厚区RANKL表达缺失。此外，*Col10a1-cre*；*Rankl*$^{f/f}$；*Osx-cre*；*Rankl*$^{f/f}$和*Ocn-cre*；Rankl$^{f/f}$敲除小鼠通过减少肥大软骨细胞RANKL表达抑制钙化骨吸收。骨小梁陷窝中的骨细胞高表达RANKL[90]。骨细胞中特异性敲除RANKL（*Dmp1-cre*；*Rankl*$^{f/f}$）导致破骨细胞数量减少，骨小梁体积增加。因此，肥大软骨细胞和骨细胞产生的RANKL对破骨细胞的形成是必不可少的。在小鼠生长板中，最后两到三层的肥大软骨细胞表达造血单核细胞来源的破骨细胞的强诱导剂RANKL[91-92]。敲除*Col10a1-Cre*小鼠中的RANKL会抑制原发海绵中软骨的吸收，表明肥大软骨细胞产生的RANKL在软骨向骨的转化过程中发挥重要作用[28]。

4 小结

本文从骨发育学和骨折愈合过程中软骨内骨化形成骨痂的机制入手，总结了肥大软骨细胞在骨折愈合中的作用，着重介绍了与血管内皮细胞、破骨细胞和成骨细胞的紧密联系（见图2）。已有的研究表明，肥大软骨细胞通过多种途径调节软骨内成骨的过程，对骨折愈合至关重要。骨折愈合是出生后组织再生的过程，概括了胚胎骨骼发育的本体论事件，这使骨折愈合成为极少数的出生后完全再生的过程之一，并使骨骼恢复到同损伤前的细胞组成、结构和生物力学功能一致的状态。既往的研究多集中于将骨髓间充质干细胞或成骨细胞与组织工程相结合，促进骨折愈合。近年来，基于软骨内成骨的模式开拓了一种全新的组织工程学方法，即发育工程学（Developmental Engineering）。与着重于模拟骨组织功能和机械特性的传统再生医学不同，发育工程学强调模拟体内骨骼发育过程，并利用调节细胞成骨分化的自然机制促进骨折愈合。肥大软骨细胞作为种子细胞可直接应用于骨折区域，更直接促进软骨内成骨，从而促进骨折愈合。未来的工作应着重于这些细胞之间通过局部和全身的可溶性因子、细胞外基质蛋白和细胞-细胞接触的相互作用和双向作用，更好地阐明肥大软骨细胞的作用，充分发挥发育工程学的理念，将肥大软骨细胞直接应用于骨折区域，辅以多功能复合材料或物理刺激，直接促进软骨内成骨，为促骨折愈合及组织工程方法学研究提供全新的思路和方法。

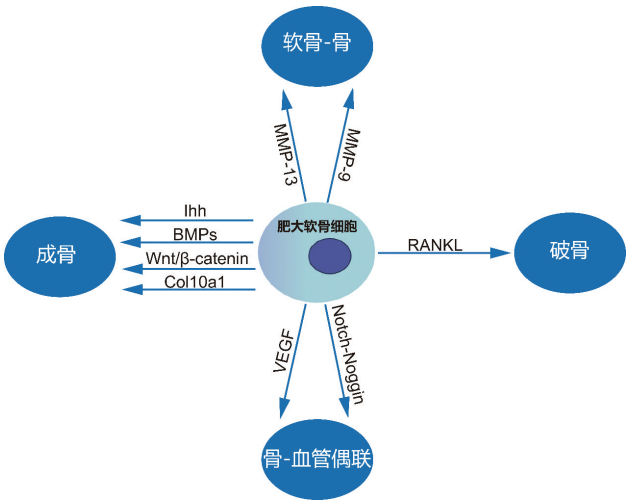


图2 肥大软骨细胞在软骨内成骨中发挥多种调节作用

参考文献

[1] EINHORN T A, GERSTENFELD L C. Fracture healing: mechanisms and interventions[J]. Nat Rev Rheumatol, 2015, 11(1): 45-54.

[2] SALHOTRA A, SHAH H N, LEVI B, et al. Mechanisms of bone development and repair[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(11): 696-711.

[3] KRONENBERG H M. Developmental regulation of the growth plate[J]. Nature, 2003, 423(6937): 332-336.

[4] HU D P, FERRO F, YANG F, et al. Cartilage to bone transformation during fracture healing is coordinated by the invading vasculature and induction of the core pluripotency genes[J]. Development, 2017, 144(2): 221-234.

[5] TSANG K Y, CHAN D, CHEAH K S. Fate of growth plate hypertrophic chondrocytes: death or lineage extension? [J]. Dev Growth Differ, 2015, 57(2): 179-192.

[6] CHENG Z, LI A, TU C L, et al. Calcium-sensing receptors in chondrocytes and osteoblasts are required for callus maturation and fracture healing in mice[J]. J Bone Miner Res, 2020, 35(1): 143-154.

[7] JULIEN A, PERRIN S, DUCHAMP DE LAGENESTE O, et al. FGFR3 in periosteal cells drives cartilage-to-bone transformation in bone repair[J]. Stem Cell Reports, 2020, 15(4): 955-967.

[8] WANG T, WANG Y, MENENDEZ A, et al. Osteoblast-specific loss of IGF1R signaling results in impaired endochondral bone formation during fracture healing[J]. J Bone Miner Res, 2015, 30(9): 1572-1584.

[9] LONG J T, LEINROTH A, LIAO Y, et al. Hypertrophic chondrocytes serve as a reservoir for marrow-associated skeletal stem and progenitor cells, osteoblasts, and adipocytes during skeletal development[J]. Elife, 2022, 11.

[10] KODAMA J, WILKINSON K J, IWAMOTO M, et al. The role of hypertrophic chondrocytes in regulation of the cartilage-to-bone transition in fracture healing[J]. Bone Rep, 2022, 17: 101616.

[11] TETI A. Bone development: overview of bone cells and signaling[J]. Curr Osteoporos Rep, 2011, 9(4): 264-273.

[12] HELMS J A, SCHNEIDER R A. Cranial skeletal biology [J]. Nature, 2003, 423(6937): 326-331.

[13] MAES C, KOBAYASHI T, SELIG M K, et al. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels[J]. Developmental Cell, 2010, 19(2): 329-344.

[14] PITSILLIDES A A, BEIER F. Cartilage biology in osteoarthritis-lessons from developmental biology[J]. Nat Rev Rheumatol, 2011, 7(11): 654-663.

[15] BERENDSEN A D, OLSEN B R. Bone development[J]. Bone, 2015, 80: 14-18.

[16] ZHANG Y, AHMADPOOR X, LIN H. Roles of local soluble factors in maintaining the growth plate: an update [J]. Genes (Basel), 2023, 14(3).

[17] ORYAN A, MONAZZAH S, BIGHAM-SADEGH A. Bone injury and fracture healing biology[J]. Biomed Environ Sci, 2015, 28(1): 57-71.

[18] KATSIMBRI P. The biology of normal bone remodelling [J]. Eur J Cancer Care (Engl), 2017, 26(6).

[19] BAHNEY C S, ZONDERVAN R L, ALLISON P, et al. Cellular biology of fracture healing[J]. J Orthop Res, 2019, 37(1): 35-50.

[20] MACKIE E J, TATARCZUCH L, MIRAMS M. The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification[J]. J Endocrinol, 2011, 211(2): 109-121.

[21] HALLETT S A, ONO W, ONO N. The hypertrophic chondrocyte: To be or not to be[J]. Histol Histopathol, 2021, 36(10): 1021-1036.

[22] CHAWLA S, MAINARDI A, MAJUMDER N, et al. Chondrocyte hypertrophy in osteoarthritis: mechanistic studies and models for the identification of new therapeutic strategies[J]. Cells, 2022, 11(24).

[23] KAMAKURA T, JIN Y, NISHIO M, et al. Collagen X is dispensable for hypertrophic differentiation and endochondral ossification of human iPSC-derived chondrocytes[J]. JBMR Plus, 2023, 7(5): e10737.

[24] JAHANGIR S, EGLIN D, POTTER N, et al. Inhibition of hypertrophy and improving chondrocyte differentiation by MMP-13 inhibitor small molecule encapsulated in alginate-chondroitin sulfate-platelet lysate hydrogel[J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 436.

[25] CHEN J, CHEN F, WU X, et al. DLX5 promotes Col10a1 expression and chondrocyte hypertrophy and is involved in osteoarthritis progression[J]. Genes Dis, 2023, 10(5): 2097-2108.

[26] ZHOU X, VON DER MARK K, HENRY S, et al. Chondrocytes transdifferentiate into osteoblasts in endochondral bone during development, postnatal growth and fracture healing in mice[J]. Plos Genetics, 2014, 10(12): e1004820.

[27] PARK J, GEBHARDT M, GOLOVCHENKO S, et al. Dual pathways to endochondral osteoblasts: a novel chondrocyte-derived osteoprogenitor cell identified in hypertrophic cartilage[J]. Biol Open, 2015, 4(5): 608-621.

[28] XIONG J, ONAL M, JILKA R L, et al. Matrix-embedded cells control osteoclast formation[J]. Nat Med, 2011, 17 (10): 1235-1241.

[29] ODGREN P R, WITWICKA H, REYES-GUTIERREZ P. The cast of clasts: catabolism and vascular invasion during bone growth, repair, and disease by osteoclasts, chondroclasts, and septoclasts[J]. Connect Tissue Res, 2016, 57(3): 161-174.

[30] FERRAO BLANCO M N, BASTIAANSEN-JENNISKENS Y M, CHAMBERS M G, et al. Effect of inflammatory signaling on human articular chondrocyte hypertrophy: potential involvement of tissue repair macrophages[J]. Cartilage, 2021, 13(2_suppl): 168S-174S.

[31] D'ANGELO M, YAN Z, NOOREYAZDAN M, et al. MMP-13 is induced during chondrocyte hypertrophy[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2000, 77(4): 678-693.

[32] WANG X, YU Y Y, LIEU S, et al. MMP9 regulates the cellular response to inflammation after skeletal injury[J]. Bone, 2013, 52(1): 111-119.

[33] ROMEO S G, ALAWI K M, RODRIGUES J, et al. Endothelial proteolytic activity and interaction with non-resorbing osteoclasts mediate bone elongation[J]. Nat Cell Biol, 2019, 21(4): 430-441.

[34] STICKENS D, BEHONICK D J, ORTEGA N, et al. Altered endochondral bone development in matrix

metalloproteinase 13-deficient mice[J]. Development, 2004, 131(23): 5883-5895.

[35] BEHONICK D J, XING Z, LIEU S, et al. Role of matrix metalloproteinase 13 in both endochondral and intramembranous ossification during skeletal regeneration[J]. PLoS One, 2007, 2(11): e1150.

[36] KOSAKI N, TAKAISHI H, KAMEKURA S, et al. Impaired bone fracture healing in matrix metalloproteinase-13 deficient mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 354(4): 846-851.

[37] KOJIMA T, HASEGAWA T, LUIZ DE FREITAS P H, et al. Histochemical aspects of the vascular invasion at the erosion zone of the epiphyseal cartilage in MMP-9-deficient mice[J]. Biomedical Research-Tokyo, 2013, 34 (3): 119-128.

[38] HU K, OLSEN B R. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration[J]. Bone, 2016, 91: 30-38.

[39] BUETTMANN E G, MCKENZIE J A, MIGOTSKY N, et al. VEGFA from early osteoblast lineage cells (Osterix+) is required in mice for fracture healing[J]. J Bone Miner Res, 2019, 34(9): 1690-1706.

[40] TUCKERMANN J, ADAMS R H. The endothelium-bone axis in development, homeostasis and bone and joint disease[J]. Nat Rev Rheumatol, 2021, 17(10): 608-620.

[41] PREIN C, BEIER F. ECM signaling in cartilage development and endochondral ossification[J]. Curr Top Dev Biol, 2019, 133: 25-47.

[42] GERBER H P, VU T H, RYAN A M, et al. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation[J]. Nature Medicine, 1999, 5(6): 623-628.

[43] HARPER J, KLAGSBRUN M. Cartilage to bone-angiogenesis leads the way[J]. Nature Medicine, 1999, 5 (6): 617-618.

[44] ZELZER E, MAMLUK R, FERRARA N, et al. VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development[J]. Development, 2004, 131(9): 2161-2171.

[45] ZELZER E, GLOTZER D J, HARTMANN C, et al. Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2[J]. Mechanisms of Development, 2001, 106(1-2): 97-106.

[46] QIN X, JIANG Q, NAGANO K, et al. Runx2 is essential for the transdifferentiation of chondrocytes into osteoblasts[J]. PLoS Genet, 2020, 16(11): e1009169.

[47] HU K, OLSEN B R. Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair[J]. J Clin Invest, 2016, 126(2): 509-526.

[48] ROMEO S G, ALAWI K M, RODRIGUES J, et al. Endothelial proteolytic activity and interaction with non-resorbing osteoclasts mediate bone elongation[J]. Nature Cell Biology, 2019, 21(4): 430-441.

[49] RAMASAMY S K, KUSUMBE A P, WANG L, et al. Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone[J]. Nature, 2014, 507(7492): 376-380.

[50] LI J, DONG S. The signaling pathways involved in chondrocyte differentiation and hypertrophic differentiation [J]. Stem Cells Int, 2016, 2016: 2470351.

[51] CHEN N, WU R W H, LAM Y, et al. Hypertrophic chondrocytes at the junction of musculoskeletal structures [J]. Bone Rep, 2023, 19: 101698.

[52] DU X, CAI L, XIE J, et al. The role of TGF-beta3 in cartilage development and osteoarthritis[J]. Bone Res, 2023, 11(1): 2.

[53] AGHAJANIAN P, MOHAN S. The art of building bone: emerging role of chondrocyte-to-osteoblast transdifferentiation in endochondral ossification[J]. Bone Res, 2018, 6: 19.

[54] SINGH P, LESSARD S G, MUKHERJEE P, et al. Changes in DNA methylation accompany changes in gene expression during chondrocyte hypertrophic differentiation in vitro[J]. Ann N Y Acad Sci, 2021, 1490(1): 42-56.

[55] LUI J C, YUE S, LEE A, et al. Persistent Sox9 expression in hypertrophic chondrocytes suppresses transdifferentiation into osteoblasts[J]. Bone, 2019, 125: 169-177.

[56] GARCIA DE VINUESA A, SANCHEZ-DUFFHUES G, BLANEY-DAVIDSON E, et al. Cripto favors chondrocyte hypertrophy via TGF-beta SMAD1 / 5 signaling during development of osteoarthritis[J]. J Pathol, 2021, 255(3): 330-342.

[57] IWAMOTO M, ENOMOTO-IWAMOTO M, KURISU K. Actions of hedgehog proteins on skeletal cells[J]. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, 1999, 10(4): 477-486.

[58] CHUNG U I, SCHIPANI E, MCMAHON A P, et al. Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development[J]. J Clin Invest, 2001, 107(3): 295-304.

[59] MAEDA Y, NAKAMURA E, NGUYEN M-T, et al. Indian Hedgehog produced by postnatal chondrocytes is essential for maintaining a growth plate and trablecular bone[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(15): 6382-6387.

[60] COLNOT C, DE LA FUENTE L, HUANG S, et al. Indian hedgehog synchronizes skeletal angiogenesis and perichondrial maturation with cartilage development[J]. Development, 2005, 132(5): 1057-1067.

[61] MURAKAMI S, NODA M. Expression of Indian

hedgehog during fracture healing in adult rat femora[J]. Calcified Tissue International, 2000, 66(4): 272-276.

[62] VORTKAMP A, PATHI S, PERETTI G M, et al. Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair [J]. Mechanisms of Development, 1998, 71(1-2): 65-76.

[63] WANG Q, HUANG C, ZENG F, et al. Activation of the Hh pathway in periosteum-derived mesenchymal stem cells induces bone formation in vivo: implication for postnatal bone repair[J]. Am J Pathol, 2010, 177(6): 3100-3111.

[64] MATSUMOTO K, SHIMO T, KURIO N, et al. Low-intensity pulsed ultrasound stimulation promotes osteoblast differentiation through hedgehog signaling[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(6): 4352-4360.

[65] MCKENZIE J A, MASCHHOFF C, LIU X, et al. Activation of hedgehog signaling by systemic agonist improves fracture healing in aged mice[J]. J Orthop Res, 2019, 37(1): 51-59.

[66] LIU X, MCKENZIE J A, MASCHHOFF C W, et al. Exogenous hedgehog antagonist delays but does not prevent fracture healing in young mice[J]. Bone, 2017, 103: 241-251.

[67] KAZMERS N H, MCKENZIE J A, SHEN T S, et al. Hedgehog signaling mediates woven bone formation and vascularization during stress fracture healing[J]. Bone, 2015, 81: 524-532.

[68] WANG F, RUMMUKAINEN P, PEHKONEN M, et al. Mesenchymal cell-derived Wnt1 signaling regulates subchondral bone remodeling but has no effects on the development of growth plate or articular cartilage in mice [J]. Bone, 2022, 163: 116497.

[69] WANG X, HE T, HE L, et al. Melatonin contributes to the hypertrophic differentiation of mesenchymal stem cell-derived chondrocytes via activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway : Melatonin promotes MSC-derived chondrocytes hypertrophy[J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 467.

[70] WANG X, GUAN Y, XIANG S, et al. Role of canonical Wnt / beta-catenin pathway in regulating chondrocytic hypertrophy in mesenchymal stem cell-based cartilage tissue engineering[J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 812081.

[71] SUN X, HUANG H, PAN X, et al. EGR1 promotes the cartilage degeneration and hypertrophy by activating the Kruppel-like factor 5 and beta-catenin signaling[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019, 1865(9): 2490-2503.

[72] MELNIK S, GABLER J, DREHER S I, et al. MiR-218 affects hypertrophic differentiation of human mesenchymal stromal cells during chondrogenesis via targeting RUNX2, MEF2C, and COL10A1[J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11 (1): 532.

[73] HOUBEN A, KOSTANOVA-POLIAKOVA D, WEIS-SENBOCK M, et al. beta-catenin activity in late hypertrophic chondrocytes locally orchestrates osteoblastogenesis and osteoclastogenesis[J]. Development, 2016, 143(20): 3826-3838.

[74] YOON D S, KIM E J, CHO S, et al. RUNX2 stabilization by long non-coding RNAs contributes to hypertrophic changes in human chondrocytes[J]. Int J Biol Sci, 2023, 19(1): 13-33.

[75] GUO X, MAK K K, TAKETO M M, et al. The Wnt/beta-catenin pathway interacts differentially with PTHrP signaling to control chondrocyte hypertrophy and final maturation[J]. PLoS One, 2009, 4(6): e6067.

[76] GARRISON P, YUE S, HANSON J, et al. Spatial regulation of bone morphogenetic proteins (BMPs) in postnatal articular and growth plate cartilage[J]. PLoS One, 2017, 12(5): e0176752.

[77] THIELEN N, NEEFJES M, WIEGERTJES R, et al. Osteoarthritis-related inflammation blocks TGF-β's protective effect on chondrocyte hypertrophy via (de)phosphorylation of the SMAD2/3 linker region[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(15).

[78] PEREZ-LOZANO M L, SUDRE L, VAN EEGHER S, et al. Gremlin-1 and BMP-4 overexpressed in osteoarthritis drive an osteochondral-remodeling program in osteoblasts and hypertrophic chondrocytes[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(4).

[79] PERRY M J, MCDOUGALL K E, HOU S C, et al. Impaired growth plate function in bmp-6 null mice[J]. Bone, 2008, 42(1): 216-225.

[80] KUGIMIYA F, KAWAGUCHI H, KAMEKURA S, et al. Involvement of endogenous bone morphogenetic protein (BMP) 2 and BMP6 in bone formation[J]. J Biol Chem, 2005, 280(42): 35704-35712.

[81] YANG L, TSANG K Y, TANG H C, et al. Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(33): 12097-12102.

[82] BAHNEY C S, HU D P, TAYLOR A J, et al. Stem cell-derived endochondral cartilage stimulates bone healing by tissue transformation[J]. Journal of Bone and Mineral Research, 2014, 29(5): 1269-1282.

[83] WANG K, MA C, FENG J Q, et al. The emerging role of cell transdifferentiation in skeletal development and diseases[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(11).

（下转第16页）